

棉铃虫酚氧化酶原基因的克隆、序列分析和组织表达

张小玉, 徐晓宇, 张俊彦, 王国秀, 刘绪生*

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

摘要: 利用 RT-PCR 和 RACE 方法, 获得了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO) 基因一个亚型 cDNA 的完整序列。该序列全长 2 405 bp, 含有一个 2 097 bp 的开放阅读框, 编码一个由 698 个氨基酸残基组成的蛋白质。推导的氨基酸序列与其他鳞翅目昆虫 PPO2 基因相应氨基酸序列有较高的同源性(76% ~ 80%), 同时该序列具有铜离子结合位点等 PPO 基因所具有的典型特征。组织特异性表达分析表明, 该基因在棉铃虫血细胞、体壁和中肠中均有表达。

关键词: 棉铃虫; 酚氧化酶原基因; 克隆; 序列分析; 组织表达

中图分类号: Q966 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2006)03-0363-04

cDNA cloning, sequence analysis and tissue expression of a prophenoloxidase gene in *Helicoverpa armigera*

ZHANG Xiao-Yu, XU Xiao-Yu, ZHANG Jun-Yan, WANG Guo-Xiu, LIU Xu-Sheng* (College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: The cDNA of *Helicoverpa armigera* prophenoloxidase (PPO) was cloned by means of RT-PCR and RACE. The cDNA was 2 405 bp in length and contained an open reading frame (ORF) of 2 097 bp which encoded 698 amino acid residues. The deduced amino acid sequence showed a high identity to the reported sequence of PPO2 from other insects and shared the typical structural features of PPO from other insects. The results of RT-PCR showed that PPO mRNA was expressed in integument, haemocyte and midgut of *H. armigera*.

Key words: *Helicoverpa armigera*; prophenoloxidase gene; clone; sequence analysis; tissue expression

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)是一种含铜离子结合位点的氧化酶,能够催化酚类物质氧化形成醌,醌再聚合成黑色素(Mason, 1955, 1965)。由酚氧化酶参与的黑色素形成在昆虫免疫反应中有着重要作用,除了包被和消除侵入的异物外,在伤口处还可以防止血淋巴的流失。另外,酚氧化酶还参与昆虫表皮硬化和色素形成(Andersen *et al.*, 1996)。酚氧化酶以无活性的酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO)形式存在于昆虫血淋巴中,通过特异性丝氨酸蛋白酶的级联反应被激活(Lai-Fook, 1966; Ashida, 1971; Ashida and Brey, 1995)。这种酶活性调控方式,既可有效地抵抗入侵的病原微生物,又可避免正常生理状态下过度活化对机体造成伤害。

酚氧化酶在昆虫生化、生理和免疫中的独特作用

引起研究者在多种昆虫中开展了相关研究。目前已有多种昆虫的 PPO 基因被克隆和分析,如烟草天蛾 *Manduca sexta*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、家蚕 *Bombyx mori*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 等(Fujimoto *et al.*, 1995; Kawabata *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1999; Taft *et al.*, 2001)。在本实验中,我们克隆了一个棉铃虫 PPO 基因,并对其组织表达特性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 试虫

棉铃虫 5 龄幼虫购自湖北省农业科学院 BT 中心养虫室。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470246); 湖北省自然科学基金项目(2005ABA130)

作者简介: 张小玉, 女, 1979 年 10 月出生, 湖北襄樊人, 动物生化与分子生物学硕士研究生, E-mail: jianer1024@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: liuxushengcn@yahoo.com.cn

收稿日期 Received: 2005-08-17; 接受日期 Accepted: 2005-10-16

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成

取棉铃虫 5 龄幼虫数头,具体数目以取足约 100 μ L 血淋巴为准。剪破其腹足,采集血淋巴,置于放在冰上的 1.5 mL Eppendorf 管中,4℃ 4 000 \times g 离心 10 min,去上清液,沉淀即为血细胞。在沉淀中加入 1 mL Trizol 试剂(上海生工公司产品),剧烈震荡至沉淀完全溶解,然后按照 Trizol 试剂说明书提取血细胞总 RNA。将取过血淋巴后的棉铃虫解剖,分别取其体壁和中肠,先去掉体壁上粘连的脂肪体等组织,再将体壁和中肠分别用 ddH₂O 清洗干净,以防上面附有血淋巴而造成误差。体壁用液氮研磨后用 Trizol 提取总 RNA,中肠用研磨器研磨后用 Trizol 提取总 RNA。3 组 RNA 样品提取后,用分光光度计测各自总 RNA 浓度,然后各取 1 μ g RNA,以 oligo(dT15)为引物,反转录合成 cDNA 第 1 链。

1.3 棉铃虫 PPO 基因 cDNA 的克隆及序列分析

1.3.1 cDNA 片段的克隆:根据已发表的昆虫(主要是鳞翅目昆虫)PPO 基因编码区的保守序列,设计 1 对简并引物。正向引物:5'-GGCA(CT)TGGCAT(CT)T(GC)GT(CTG)TAC(CT)CC-3'(位于图 1 核苷酸序列 729 ~ 750 之间);反向引物:5'-C(CGT)CGCAT(AC)G(TC)T(CT)GT(ACG)GC(TC)TC-3'(位于图 1 核苷酸序列 1 261 ~ 1 279 之间)。以血细胞 cDNA 第 1 链为模板,用上述简并引物进行 PCR 扩增。50 μ L 反应体系中含:正向引物和反向引物各 2.5 μ L, cDNA 2.5 μ L, premix Taq(大连宝生物公司产品)25 μ L,补 ddH₂O 17.5 μ L。样品先 94℃ 预变性 5 min,然后按下述条件进行 PCR 扩增反应:94℃ 30 s,54℃ 30 s,72℃ 1 min,循环 35 次后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,对目的片段进行切胶回收、纯化。按 pMD-18T 载体试剂盒(大连宝生物公司产品)说明书将纯化的目的片段与 pMD-18T 载体连接,重组质粒转化入 DH5 α 感受态细菌,通过蓝白斑筛选,将阳性克隆菌液送交上海博亚公司进行测序(测 3 个克隆)。将测得的 cDNA 序列翻译成氨基酸序列,用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)进行同源性分析,鉴定是否为 PPO 基因 cDNA 片段。

1.3.2 RACE:根据获得的 PPO 基因 cDNA 片段设计 1 对特异性引物 GSP1 和 GSP2,分别用于 5'-RACE 和 3'-RACE。GSP1:5'-ACTGCTCGTGCCGTCCGCTTACTCAC-3'(位于图 1 核苷酸序列 1 079 ~ 1 105 之间),GSP2:5'-CGTAGAGGCGAGCTGTTCTTCTACATGC-3'(位于图 1 核苷酸序列 788 ~ 815 之间)。用 SMART RACE cDNA amplification kit(Clontech 公司产品)进行

RACE,详细方法见该公司的产品说明书。克隆、检测及测序后,用 DNASTAR 软件包中的 EditSeq 软件进行序列拼接,得到 PPO 基因 cDNA 的全序列。将 cDNA 序列翻译成氨基酸序列,用 BLAST 软件在 NCBI 上进行同源性分析。氨基酸序列排列使用 ClustalW 软件(<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>)。

1.4 半定量 RT-PCR 方法分析 PPO 基因在棉铃虫体壁、血细胞和中肠中的表达

根据获得的棉铃虫 PPO 基因的 cDNA 序列,设计 1 对特异性引物(PPO-U 和 PPO-L)进行半定量 PCR,PPO-U:GGCGAGCTGTTCTTCTACATGC(位于图 1 核苷酸序列 794 ~ 815 之间);PPO-L:TCCAGATAGCGGTGAGTAGGGT(位于图 1 核苷酸序列 1 221 ~ 1 242 之间),预期 PCR 产物为 449 bp 左右。预备实验表明用这一对特异性引物在棉铃虫基因组中不能扩增出条带,说明用这一对引物进行半定量表达是可行的,可以排除基因组干扰。同时用棉铃虫 Actin 基因特异性引物(Actin-U 和 Actin-L)进行 PCR 作为对照。Actin-U:CGCGACCTCACAGACTACCT;Actin-L:GGCCAGACTCATCGTACTCCT。PCR 反应体系如下:以 1 μ L cDNA 为模板,加入上下游引物各 1 μ L,premix Taq 12.5 μ L,补 ddH₂O 至 25 μ L。反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共循环 35 次,最后 72℃ 再延伸 10 min。PCR 反应完成后,精确吸取 10 μ L 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,EB 染色,拍照。

2 结果和分析

2.1 PPO 基因 cDNA 全序列克隆结果及序列同源性比较

通过 RT-PCR 和 RACE 获得棉铃虫 PPO 基因 cDNA 全序列(GenBank 序列号:DQ114946),总长度为 2 405 bp,经 EditSeq 软件进行开放阅读框(open reading frame,ORF)分析,发现一个 2 097 bp 的最大开放阅读框,其位置在 71 ~ 2 167 bp,起始密码为 ATG,终止密码为 TAA(图 1),编码一个由 698 个氨基酸残基组成的蛋白质。该基因序列具有与其他鳞翅目昆虫 PPO 基因相似的推测的丝氨酸蛋白酶酶切位点(位于图 1 氨基酸序列 57 ~ 58 之间)和 2 个高度保守的铜离子结合位点(位于图 1 氨基酸序列 207 ~ 251 和 352 ~ 419 处)及位于铜离子结合位点内的 6 个保守的组氨酸残基(图 1 氨基酸序列 219、223、249、371、376 和 412 处)(图 1)。

GATTCCACTTCACAGTTTCTGTGAAGTGAGTTATTTTTTATTCCTTTTGAATAAAATTAATTTTAGTAAATGGCCGA	78
M A D	3
CGAAGAACAATCCGTCAAAATCATCGAAAGTTCAAGTTGCTGTTTCGATCGGCCAAACGAACCTTTGATTACTCCTAA	156
E E Q I R Q I I E S F K L L F D R P N E P L I T P K	29
GGGTGACAAAAAGCTCTGTTTCAGCTCACCAGAAAGCTTGTGCTCCGGAGTATTCAAACAATGGCGTGGAATTA	234
G D K K A L F Q L T E K L V P P E Y S N N G V E L N	55
CGACCGTTTGGTGATGACGCCATGAAAGGATTCCGCTGAAGACCCCTGGACAGATACCCCTCAGTTCACCGTCGCGTC	312
D R F G D D A T E R I P L K T L D R Y P Q F T V A S	81
GCAACTGCCTGCCGATGCCGACTTCTCGCTGTTCTTCCGAAACACCAGGAGATGGCCACTGAGGTTCATCGACGCTCT	390
Q L P A D A D F S L F L P K H Q E M A T E V I D A L	107
TTTGGGTGTTCTGAAAATCAGTTGCAAGACTTTCTGTCAACCTGTGTGTTGCCAGAGGCAACCTGAACCCACAGCT	468
L G V P E N Q L Q D F L S T C V F A R G N L N P Q L	133
GTTCAACTACTGTTACTCAGTAGCATTGATGCATCGTAAGGACACCAAGAATGTGCCATACAGAATTTTGTGAGAC	546
F N Y C Y S V A L M H R K D T K N V P I Q N F A E T	159
TTTCCCTCAAGTTTCATGGAGTTCGCAAGTTTCCAACAAGCTCGTGAGACAGAGCTGTATCCCCCAAAATGTGCC	624
F P S K F M D S Q V F Q Q A R E T A A V I P Q N V P	185
ACGTACACCAATTATCATCCCAAGAGACTACACTGCTACTGATTGGAAGAAGAACATCGTCTGGCCTATTTCCGTGA	702
R T P I I I P R D Y T A T D L E E E H R L A Y F R E	211
AGATATTGGCGTTAACTTGCATCACTGGCATTGGCATCTTGATATCCGTTCACTGCATCCCAGAGAGCTATCGTTGC	780
D I G V N L H W H W L V Y P F T A S Q R A I V A	237
TAAAGCTGTAGAGGAGCTGTTCTTCTACATGCATCAACAATTATGCTCGCTACAACGGTGAGCGCTCAACAA	858
K D R R G G E L F F Y M Q Q L I A R Y N G E R L V N	263
CTCACTTAAGAGAGTGAAGAAGTTTCAGCAACTGGAGGGAACCAATCCCTGAGGCCTACTTCCCCAAGCTGGACAGTCT	936
S L K R V K K F S N W R E P I P E A Y F P K L D S L	289
TACATCATCCCGCGGCTGGCCCCACGGCAAGCCAACATGCAGTGGCAGGACTTGAACCGTCCCGTTGACGGACTTAA	1 014
T S S R G W P P R Q A N M Q W Q D L N R P V D G L N	315
CGTCACCATTAAACGACATGGAAGATGGAGGAGAAACATTGAGGAAGCATCTCTACCGGCACAGTGACTAACCGGGA	1 092
V T I N D G M A R R T V R N I E E A I S T G T V N A D	341
CGGCACGACCACTCTCTCGACATCGACATTCTGGGCAACATGTGGAGGCCAGCATCTGTCTCCCAACAGGGAGCT	1 170
G T T S P L D I D I L G N M L E A S I L S P N R E L	367
CTACGGCAGCATACACAACCGGCACAGCTTCTCTGCCTACATACATGACCCTACTACCGCTATCTGAAAAGCTT	1 248
Y G S I N N G S F S A Y I H D P T H R Y L E S F	393
CGGTGTTATTGCTGACGAGGCAACCAATGCGTGATCCGTTCTTCTTCCGCTGGCAGCGGTGGATCGATGACATCTG	1 326
G V I A D E A T T M R D P F F F R W A W I D D I C	419
CCAGAAGCACAGGAGTCTTCTATGCGCCCTACACTCGCTCTGAGCTCGAGAACCCCGCGGTGTCAGTGACATC	1 404
Q K H K E S S Y V R P Y T R S E L E N P G V S V T S	445
GGTATCAGTGGAGACACAAGCGGCCAGCCCAACACCTTGAACACTTTCTGGATGTCCAGTGACGTGGACCTATCTCG	1 482
V S V E T Q G G Q P N T L N T F W M S S D V D L S R	471
TGGCTTGGACTTCTCCGACCGTGGCCCGTATACGCCCGCTTCACTCATCTTAACAACCGACCTTCCGTTATGTCAT	1 560
G L D F S D R G P V Y A R F T H L N N R P F R Y V I	497
TAACGTTAACAACACTGGTATGGCCCGCCGACCACTGTTCTGATCTTTCATCGGCCCAAGTTTGACGAACGTAACTT	1 638
N V N N T G M A R R T T V R I F I A P K F D E R N L	523
AGCCTGGGCCCTCTCCGATCACCGCAAGATGTTCAATTGAGATGGACAGATTCTGGGTACCATTAACCGCCGCCAGAA	1 716
A W A L S D H R K M F I E M D R F V V P L N A G Q N	549
CACCATCACAGTTTATCAACGGAGTCTTCCGTGACGATTCCGTTCGAACAGAGCTTCCGTGACCTCTCTGTTACAG	1 794
T I T R L S T E S S V T I P F E Q T F R D L S V Q S	575
CAACGCCCTCGCGCCCAACTTGGCCGAGTTCAACTTCTGCGGTGGCGCTGGCCCCAGCACATGTTGGTCCCCAA	1 872
N D P R G R P N A L E F N F C G C G W P Q H M L V P K	601
GGGTACTGAGCGGGCGCGCCTACCACTGTTGTTGTTATGCTTTCGAACTACGATCTTGACAGCGTGAACAACTGA	1 950
G T E A G A A Y Q L F V M L S N Y D L D S V E Q P D	627
CGGCTCACAGTTGAGCTGCGTCGAAGCTTCCAGTTTCTGCGGTCTGAAGGACAGAAAGTACCCTGACCGTCGCGCTAT	2 028
G S Q L S C V E A S S F C G L K D R K Y P D R R A M	653
GGGCTTCCCCTTCGACAGGCCTCAAGCACAGCCACTAACATTGAAGATTTCATCCTGCCAACATGGGACTTCAAGA	2 160
G F P F D R P S T A T N I E D F I L P N M G L Q D	679
CATCACCATCAGGCTGTCAAACAGCACTGAGCCAAACCAAGGAACCAAGAACCACTAAGGAACGATAATTATTA	2 184
I T I R L S N T T E P N P R N P R T N *	698
CTAATTGGCAACTTACAAAAGGAAAATGAATTAATATAGGTAGAAATAGCATTAAAAAATTAAGGCTGATATTAA	2 262
GTTGATAGAGCTAAGTGTAATACGTACATAAAATAGGAAATTAATTTCTGTTAATTTAAGACCCGTTTACTAGTTT	2 340
TATTTATAAGATTACATAAAATATATCCATAGCGAAAAAATATATATATATATATATATATATATATATATATAT	2 405

图 1 棉铃虫 PPO 基因 cDNA 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 cDNA sequence and deduced amino sequence of PPO in *Helicoverpa armigera*

图中箭头表示推测的丝氨酸蛋白酶切位点，下划线表示两个铜离子结合位点，矩形框表示两个铜离子结合位点内的 6 个高度保守的组氨酸残基
Arrow showed a possible cleavage site for proteolytic activation of the enzyme. Two copper bidding sites were underlined. Six conserved histidine residues were boxed.

同源性分析表明,所获得的棉铃虫 PPO 基因的氨基酸序列与其他鳞翅目昆虫 PPO2 基因相应的氨基酸序列同源性较高,而与 PPO1 的同源性较低。如与大蜡螟 *Galleria mellonella* PPO2 和 PPO1(蛋白质序列号分别为 AAQ75026 和 AAK64363)的同源性分别为 80% 和 49%,与美国白蛾 *Hyphantria cunea* PPO2 和 PPO1(蛋白质序列号分别为 AAC34256 和 AAC34251)的同源性分别为 80% 和 49%,与家蚕 PPO2 和 PPO1(蛋白质序列号分别为 BAA08369 和 BAA08368)的同源性分别为 78% 和 50%,与烟草天蛾 PPO2 和 PPO1(蛋白质序列号分别为 AAC37243 和 AAC05796)的同源性分别为 76% 和 50%。与其他目昆虫 PPO 氨基酸序列也有较高的同源性,如与家蝇 *Musca domestica*(蛋白质序列号: AAC37243)的同源性为 58%。

2.2 组织特异性表达

通过半定量 RT-PCR 检测了 PPO 基因在棉铃虫 5 龄幼虫体壁、血细胞、中肠中的表达情况(图 2)。结果表明, PPO 基因在这 3 种组织中均有表达。

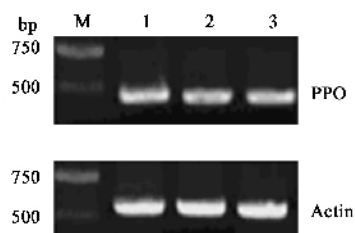


图 2 棉铃虫 PPO 基因在 5 龄幼虫 3 种组织中的表达

Fig. 2 Tissue specific expression of PPO transcript in three tissues of 5th instar larvae of *Helicoverpa armigera*

M: 分子量标记 DL2000 Marker; 1: 体壁 Integument;

2: 血细胞 Haemocyte; 3: 中肠 Midgut.

3 讨论

利用 RT-PCR 和 RACE 方法获得了棉铃虫 PPO 基因 cDNA 的完整序列。大多数昆虫如家蚕、大蜡螟和美国白蛾等的 PPO 基因都有两个亚型: 即 PPO1 和 PPO2。同源性分析表明,我们克隆的棉铃虫 PPO 基因氨基酸序列与其他鳞翅目昆虫 PPO2 基因氨基酸序列的同源性较高(76% ~ 80%),而与 PPO1 基因氨基酸序列的同源性较低(49% ~ 50%),表明我们克隆的棉铃虫 PPO 基因可能为 PPO2。在棉铃虫中是否也存在 PPO1 基因,还有待进一步研究。

在 PPO 基因组织特异性表达方面,除了血细胞外,目前在冈比亚按蚊的中肠(Müller *et al.*, 1999),

斯氏按蚊 *Anopheles stephensi* 的脂肪体和体壁(Cui *et al.*, 2000),西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的体壁(Anete *et al.*, 2005)等其他部位也发现了 PPO mRNA 的表达;但是,在骚扰阿蚊 *Armigeres subalbatus* 中,只在血细胞中检测到了 mRNA 的表达,而在中肠、卵巢等中均未检测到(Cho *et al.*, 1998)。这些研究结果表明, PPO 虽然首先在血淋巴被发现,但血淋巴并不是 PPO 唯一表达的地方,对于不同的物种, PPO 的组织表达可能存在一定的差异。我们利用半定量 RT-PCR 方法,在棉铃虫体壁、中肠和血细胞中都检测到了 PPO 的转录,这一结果也支持上述观点。

参考文献(References)

- Andersen SO, Peter MG, Roepstorff P, 1996. Cuticular sclerotization in insects. *Comp. Biol. Chem. Physiol.*, 113: 689–705.
- Anete PL, Maria SZ, Márcia MGB, Zilá LPS, 2005. Molecular characterization of a cDNA encoding prophenoloxidase and its expression in *Apis mellifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 541–552.
- Ashida M, 1971. Purification and characterization of pro-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 144: 749–762.
- Ashida M, Brey PT, 1995. Role of the integument in insect defense: prophenoloxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 10 698–10 702.
- Cho WL, Liu HS, Lee CH, Kuo CC, Chang TY, Liu CT, Chen CC, 1998. Molecular cloning, characterization and tissue expression of prophenoloxidase cDNA from the mosquito *Armigeres subalbatus* inoculated with *Dirofilaria immitis* microfilariae. *Insect Mol. Biol.*, 7 (1): 31–40.
- Cui L, Luckhart S, Rosenberg R, 2000. Molecular characterization of a prophenoloxidase cDNA from the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Insect Mol. Biol.*, 9: 127–137.
- Fujimoto K, Okino N, Kawabata SI, Iwanaga S, Ohnishi E, 1995. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenoloxidase A1 of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7 769–7 773.
- Jiang H, Wang Y, Ma C, Kanost MR, 1997. Subunit composition of prophenoloxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit Pro-PO-P1. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 835–850.
- Kawabata T, Yasuhara Y, Ochiai M, Matsuura S, Ashida M, 1995. Molecular cloning of insect pro-phenoloxidase: a copper containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7 774–7 778.
- Lai-Fook J, 1966. The repair of wounds in the integument of insects. *J. Insect Physiol.*, 12: 195–226.
- Mason HS, 1955. Comparative biochemistry of the phenolase complex. *Adv. Enzymol.*, 16: 105–184.
- Mason HS, 1965. Oxidases. *Ann. Rev. Biochem.*, 34: 595–634.
- Müller HM, Dimopoulos G, Blass C, Kafatos FC, 1999. A hemocyte-like cell line established from the malaria vector *Anopheles gambiae* expresses sex prophenoloxidase genes. *J. Biol. Chem.*, 274: 11 727–11 735.
- Taft AS, Chen CC, Christensen BM, 2001. Molecular cloning of two prophenoloxidase genes from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 10: 97–103.